

طراحی بیوانفورماتیکی پروتئین گیرنده $IFN-\alpha/\beta$ نوترکیب برای مقابله با اثرات

آنتاگونیستی پروتئین VP35 ویروس ابولا

یاسر قاضی* و فاطمه حدادی

کارشناس ارشد زیست شناسی

استادیار دانشگاه زابل - دانشگاه زابل گروه زیست شناسی

ghaziyas69@gmail.com

چکیده

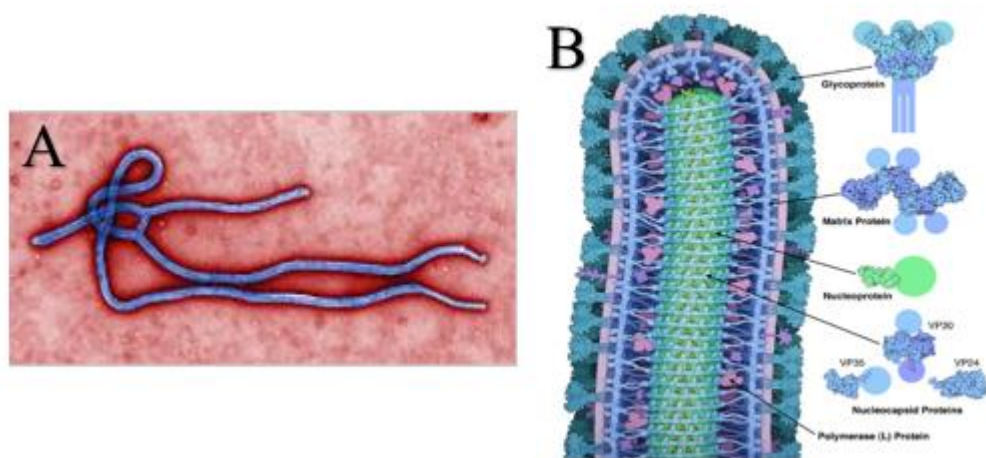
پروتئین VP35 ویروس ابولا یکی از مهمترین ترکیبات بیماری‌زایی واکنش‌کننده با سلول‌های میزبان است که با پاسخ ایمنی‌زایی طبیعی سلول‌های بدن تداخل ایجاد می‌کند. VP35 این کار را با توانایی آنتاگونیستی خود که مانع از فعالیت فاکتور تنظیمی اینترفرون به نام پروتئین فاکتور ۳ (IRF-3) در سلول‌های آلوده به ویروس می‌شود انجام می‌دهد و القا بیان ژن‌های ضد ویروسی را مختل می‌کند. در مطالعه حاضر ما در فضای مجازی پروتئین گیرنده $IFN\alpha/\beta$ نوترکیبی را طراحی کرده‌ایم که می‌تواند توسط سلول‌های میزبان به داخل سیستم گردش خون ترشح شود. زمانی که بدن در معرض ویروس ابولا قرار می‌گیرد پروتئین نوترکیب می‌تواند با پروتئین VP35 ویروس برهمکنش داشته و اثرات آنتاگونیستی آن را بر روی پروتئین IRF-3 خنثی کند. با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی میزان توانایی پروتئین طراحی شده برای برهمکنش با پروتئین ویروس و خنثی‌سازی اثرات آن مورد ارزیابی قرار گرفت. با این وجود برای بدست آوردن نتایج بهتر و استفاده از پروتئین طراحی شده به عنوان یک پتانسیل درمانی باید بررسی‌های بیشتری در آینده در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* انجام شود.

کلمات کلیدی: آنتاگونیست، بیوانفورماتیک، پروتئین VP35، گیرنده $IFN\alpha/\beta$ ، ویروس ابولا

مقدمه

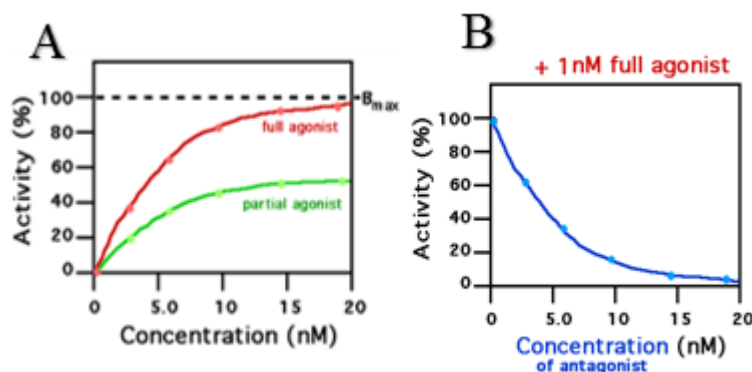
(۴) که عبارتند از نوکلئوپروتئین (NP)، گلیکوپروتئین (GP)، گلیکوپروتئین محلول، VP24، VP30، VP35، VP40 و RNA پلی مرز وابسته به RNA (L-پروتئین) (۴ و ۵). یک جز حیاتی در مسیر بیماریزایی ویروس ابولا پروتئین VP35 می باشد. پروتئین مزبور با مقاومت طبیعی سلولهای میزبان در برابر عفونتهای ویروسی تداخل می کند و این امر در واقع عامل گسترش عفونت در بدن می شود.

ویروس ابولا (Ebola) (شکل ۱) جز خانواده فیلوویریده است و با تب خونریزی دهنده کشنده در انسان و پرماتهای غیر انسان در ارتباط است (۱ و ۲). مخزن طبیعی ابولا ناشناخته است و در حال حاضر هیچ گونه واکسن و درمان موثری برای انسان وجود ندارد و تلاش ها برای تهیه واکسن این بیماری ادامه دارد. ژنوم آن بصورت یک RNA تک رشته ای منفی به اندازه ۱۹kb می باشد. هشت پروتئین مختلف بوسیله ژنوم ویروس کد می شوند (۳ و



شکل ۱- ساختار ویروس ابولا زیر میکروسکوپ (A) و به شکل شماتیک (B)

هیچ‌گونه پاسخ و واکنش از سوی سلول نمی‌شود. آنتاگونیست در فارماکولوژی تقلیدکننده عمل یک آگونیست در سلول است ولی با مسدود کردن محل اتصال (سایت فعال) مانع از اتصال و عمل آگونیست می‌گردد یا به اصطلاح عمل را انجام می‌دهد ولی تأثیر نمی‌کند (شکل ۲).

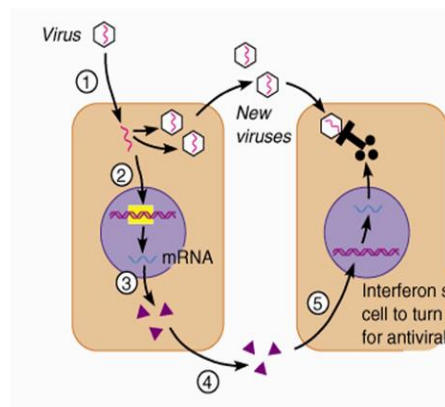


شکل ۲- نحوه عملکرد آگونیست (A) و آنتاگونیست (B)

تنظیم کننده اینترفرون (IRF-3) که یک جز اصلی در مسیر آبشار سیگنال‌دهی اولیه پاسخ سلول‌ها به عفونت‌های ویروسی قرار دارد می‌شود (۱۰). IRF-3 در همان مراحل اولیه عفونت ویروسی در حضور مولکول dsRNA در داخل سلول فعال می‌شود و با فاکتورهای رونویسی دیگری که بیان ژن‌های ضد ویروسی اولیه مانند IL-15, IFN α /b, ISG15 و ISG56 را باعث می‌شوند برهم کنش ایجاد می‌کند (۱۱).

نشان داده شده است که VP35 بعنوان یک آنتاگونیست اینترفرون عمل می‌کند (۶). آنتاگونیست در فارماکولوژی و بیوشیمی کاربرد دارد و نوعی لیگاند و ماده شیمیایی قابل پیوند با گیرنده سلولی و یا گونه‌ای دارو است که در سلول با اتصال به گیرنده‌های آن سلول عمل پیوند لیگاند-گیرنده را انجام داده ولی باعث

VP35 ممکن است همانندسازی ویروس در داخل سلول‌های عفونی را تسهیل کند و این عمل با مسدود کردن پاسخ ایمنی ضد ویروسی نرمال که توسط تولید اینترفرون القا می‌شود انجام می‌گیرد (۷). اینترفرون‌ها خانواده‌ای از سیتوکین‌ها هستند که در پاسخ به عفونت‌های ویروسی تولید می‌شوند. آنها بعنوان عوامل ضد ویروسی، بازدارنده‌های رشد سلولی و تنظیم کننده‌های ایمنی عمل می‌کنند (شکل ۳) (۸) و (۹). بطور کلی VP35 مانع از فعال سازی فاکتور



شکل ۳- نحوه‌ی عملکرد اینترفرون

پروتئین مذکور به عنوان دارو مکمل و یا در زمینه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حال حاضر با کشف ساختار کلیدی پروتئین VP35 می‌توان اطلاعات لازم برای تولید داروهای ضد ویروسی را بدست آورده و از آن در زمینه تولید این داروها بهره گرفت. عملکرد پروتئین به شدت وابسته به ساختار فضایی پروتئین است و این موضوع می‌تواند چشم انداز جدیدی در درمان بیماری‌ها باشد تا جایی که امروزه استفاده از اطلاعات مربوط به ساختار سوم پروتئین‌ها از روش‌های اساسی در طراحی منطقی داروها به شمار می‌رود.

برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب از تکنیک‌های مولکولی استفاده می‌شود که در آن ژن مورد نظر توسط حامل‌هایی به نام وکتور درون باکتری‌های مخصوصی وارد شده تا بعنوان جزئی از ژن باکتری و به همراه آن تکثیر شده و پروتئین مورد نظر همراه با سایر پروتئین‌های باکتری بیان گردد. سپس با روش‌های مختلف کروماتوگرافی ستونی پروتئین‌ها خالص سازی شده و خصوصیات آن از لحاظ فعالیت بیولوژیکی و ساختمانی با روش‌هایی مانند روش ELISA مورد بررسی قرار می‌گیرد. پس از طی مراحل ذکر شده

مواد و روش‌ها

نرم افزارهای بیوانفورماتیکی پروتئین مذکور در فضای مجازی مورد آنالیز قرار گرفت. قبل از

در ابتدا توالی آمینواسیدی پروتئین $IFN-\alpha/\beta$ از پایگاه NCBI استخراج شد. با استفاده از

بهبود یافتند. با استفاده از سایت GPMaw <http://www.alphalyse.com/gpmaw-lite.html> شاخص هیدروفوبیسیته و با کمک سایت PepDraw <http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html> بار خالص پروتئین IFN α/β طبیعی بدست آمد و در پروتئین نو ترکیب دچار تغییرات شدند. با استفاده از توالی سیگنال پپتید تعدادی از پروتئین های ترشحی که توسط سایت SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> پیش بینی و نواحی حفاظت شده آنها توسط سایت ClustalO <http://www.uniprot.org/align/> شناسایی شدند، توالی سیگنال پپتیدی جهت ترشح پروتئین به خارج از سلول طراحی و جانشین توالی سیگنال پپتیدی شد که پروتئین را به غشای سلول هدایت می کرد. در ادامه برای بررسی عملکرد پروتئین طراحی شده شبکه ژنی دخیل در مسیر فعالیت آن با استفاده از سایت STRING- <http://string-db.org> شناسایی گردید و با شبکه ژنی IFN α/β پروتئین مرتبط به مسیر فعالیت پروتئین IFN α/β طبیعی مقایسه گردید. اگر همان شبکه ژنی که در مسیر فعالیت پروتئین IFN α/β طبیعی وجود دارد برای پروتئین IFN α/β نو ترکیب نیز شناسایی شود می توان تا حدودی به

ایجاد هر گونه تغییراتی در توالی آمینواسیدی پروتئین مذکور فرآیند تمایل کدونی آن با استفاده از نرم افزار dnasp5.exe (<http://www.ub.edu/dnasp>) مورد بررسی قرار گرفت. برای طراحی پروتئین IFN- α/β نو ترکیب ابتدا با استفاده از سایت ProDom <http://prodom.prabi.fr/> دومین های عملکردی و حفاظت شده پروتئین شناسایی شدند تا بدون ایجاد تغییرات در ساختار پروتئین نو ترکیب اعمال شوند. چون پروتئین طراحی شده قرار است به داخل جریان خون انتقال داده شود برای افزایش احتمال برخورد پروتئین نو ترکیب با پروتئین vp35 ویروس ابولا دومین های حفاظت شده که احتمال می رود محل برهمکنش دو پروتئین فوق باشند در چندین محل دیگر در داخل توالی پروتئین مستقر شده اند. در نواحی مجاور دومین های شناسایی شده تعدادی آمینواسید سیستمین اضافه شد تا در صورت وجود سیستمین در پروتئین vp35 بین آنها پیوندهای دی سولفیدی برقرار شود.

با استفاده از سایت ProtParam <http://web.expasy.org/protparam> برخی خواص بیوفیزیکی پروتئین شامل نیمه عمر، شاخص پایداری، شاخص آلفاتیک و ... شناسایی و در پروتئین IFN- α/β طراحی شده

(trans.html) توالی نوکلئوتیدی پروتئین طراحی شده بدست آمد.

نتایج و بحث

نرم افزار dnasp5 فرآیند تمایل کدونی را برای پروتئین VP34 نشان داد. بر اساس جدول زیر می توان پروتئین نو ترکیب را به نحوی طراحی کرد تا بیشترین شباهت ممکن را با پروتئین اصلی داشته باشد. سایت ProDom دو دومین اصلی را در توالی آمینواسیدی پروتئین IFN α/β شناسایی کرد که در موقعیت های ۸ تا ۱۲۱ و ۱۳۲ تا ۲۳۱ قرار داشتند (شکل ۵).
نرم افزار Molegro Molecular Viewer ساختار فضایی و توالی آمینواسیدهای محل برهمکنش پروتئین - لیگامد را نشان داد (شکل ۶).

عملکردی بودن پروتئین طراحی شده پی برد.

از سایت NetNGlyc
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>
yc برای شناسایی نواحی قابل گلیکوزیلایسون

و از سایت Allerdicator

(<http://allerdicator.vbi.vt.edu>) برای بررسی خواص آلرژی زایی پروتئین طراحی شده استفاده گردید. علاوه بر این توالی آمینواسیدی پروتئین طراحی شده برای پیش بینی ساختار فضایی وارد سایت Phyre2

(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) گردید و از نرم افزار

Molegro Molecular Viewer (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Molegro-Molecular-Viewer.shtml>) برای ترسیم ساختار فضایی

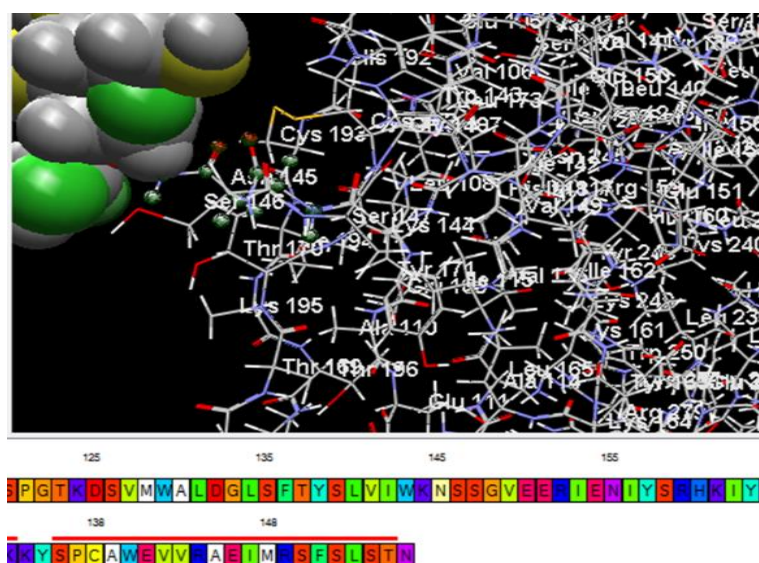
استفاده گردید. در انتها با استفاده از سایت Reverse Translate
<http://www.bioinformatics.org/sms2/rev>

RSCU and Codon Usage Table of: Hsa1											
Scaled Chi-squared: 0.388											
UUU-F	3 (0.60)	UCU-S	1 (0.60)	UAU-Y	1 (0.22)	UGU-C	1 (0.67)	UUU-F	3 (0.60)	UCU-S	1 (0.60)
UUC-F	7 (1.40)	UCC-S	4 (2.40)	UAC-Y	8 (1.78)	UGC-C	2 (1.33)	UUC-F	7 (1.40)	UCC-S	4 (2.40)
UUA-L	4 (0.73)	UCA-S	4 (2.40)	UAA-*	0 (0.00)	UGA-W	3 (1.50)	UUA-L	4 (0.73)	UCA-S	4 (2.40)
UUG-L	1 (0.18)	UCG-S	0 (0.00)	UAG-*	0 (0.00)	UGG-W	1 (0.50)	UUG-L	1 (0.18)	UCG-S	0 (0.00)
CUU-L	7 (1.27)	CCU-P	1 (0.27)	CAU-H	2 (0.67)	CGU-R	2 (1.33)	CUU-L	7 (1.27)	CCU-P	1 (0.27)
CUC-L	6 (1.09)	CCC-P	9 (2.40)	CAC-H	4 (1.33)	CGC-R	1 (0.67)	CUC-L	6 (1.09)	CCC-P	9 (2.40)
CUA-L	12 (2.18)	CCA-P	3 (0.80)	CAA-Q	6 (1.71)	CGA-R	3 (2.00)	CUA-L	12 (2.18)	CCA-P	3 (0.80)
CUG-L	3 (0.55)	CCG-P	2 (0.53)	CAG-Q	1 (0.29)	CGG-R	0 (0.00)	CUG-L	3 (0.55)	CCG-P	2 (0.53)
AUU-I	7 (0.64)	ACU-T	5 (0.95)	AAU-N	2 (0.57)	AGU-S	1 (0.60)	AUU-I	7 (0.64)	ACU-T	5 (0.95)
AUC-I	15 (1.36)	ACC-T	8 (1.52)	AAC-N	5 (1.43)	AGC-S	0 (0.00)	AUC-I	15 (1.36)	ACC-T	8 (1.52)
AUA-M	8 (1.60)	ACA-T	8 (1.52)	AAA-K	4 (2.00)	AGA-*	0 (0.00)	AUA-M	8 (1.60)	ACA-T	8 (1.52)
AUG-M	2 (0.40)	ACG-T	0 (0.00)	AAG-K	0 (0.00)	AGG-*	0 (0.00)	AUG-M	2 (0.40)	ACG-T	0 (0.00)
GUU-V	1 (0.31)	GCU-A	4 (1.14)	GAU-D	3 (0.55)	GGU-G	2 (0.73)	GUU-V	1 (0.31)	GCU-A	4 (1.14)
GUC-V	7 (2.15)	GCC-A	5 (1.43)	GAC-D	8 (1.45)	GGC-G	4 (1.45)	GUC-V	7 (2.15)	GCC-A	5 (1.43)
GUA-V	5 (1.54)	GCA-A	4 (1.14)	GAA-E	8 (1.45)	GGA-G	3 (1.09)	GUA-V	5 (1.54)	GCA-A	4 (1.14)
GUG-V	0 (0.00)	GCG-A	1 (0.29)	GAG-E	3 (0.55)	GGG-G	2 (0.73)	GUG-V	0 (0.00)	GCG-A	1 (0.29)

شکل ۴- نتایج فرآیند تمایل کدونی که توسط نرم افزار dnasp5

Interval		E-value	
13-118		2.22e-20	
134-227		5.79e-12	

شکل ۵- دومین‌های شناسایی شده توسط سایت ProDom



شکل ۶- شناسایی محل برهمکنش پروتئین-لیگاند و توالی آمینواسیدی مربوط به آن

طبق جدول ۱ بالاترین نیمه‌عمر در پستانداران مربوط به آمینواسید والین است که ۱۰۰ ساعت می‌باشد. بر همین اساس به ابتدای توالی آمینواسیدی پروتئین $\text{ifn}\alpha/\beta$ طراحی شده بلافاصله بعد از توالی سیگنال پپتید یک عدد آمینواسید والین اضافه گردید.

طبق پیش‌بینی سایت ProtParam نیمه‌عمر پروتئین $\text{IFN}\alpha/\beta$ پس از حذف توالی سیگنال پپتید در داخل بدن پستانداران ۱/۹ ساعت است که مربوط به آمینواسید سرین می‌باشد.

نیمه‌عمر (half-life) عبارتند از مدت زمانی که طول می‌کشد تا نصف مقدار پروتئین بعد از سنتز در داخل سلول ناپدید شود (۱۲).

جدول ۱- مقایسه نیمه عمر آمینواسیدها در پستانداران، مخمر و باکتری *E.coli*

Amino acid	Mammalian	Yeast	E. coli
Ala	4.4 hour	>20 hour	>10 hour
Arg	1 hour	2 min	2 min
Asn	1.4 hour	3 min	>10 hour
Asp	1.1 hour	3 min	>10 hour
Cys	1.2 hour	>20 hour	>10 hour
Gln	0.8 hour	10 min	>10 hour
Glu	1 hour	30 min	>10 hour
Gly	30 hour	>20 hour	>10 hour
His	3.5 hour	10 min	>10 hour
Ile	20 hour	30 min	>10 hour
Leu	5.5 hour	3 min	2 min
Lys	1.3 hour	3 min	2 min
Met	30 hour	>20 hour	>10 hour
Phe	1.1 hour	3 min	2 min
Pro	>20 hour	>20 hour	?
Ser	1.9 hour	>20 hour	>10 hour
Thr	7.2 hour	>20 hour	>10 hour
Trp	2.8 hour	3 min	2 min
Tyr	2.8 hour	10 min	2 min
Val	100 hour	>20 hour	>10 hour

i می‌باشد. برای پروتئین‌های پایدار شاخص ناپایداری (Ii) کمتر از ۴۰ است و زمانی که این شاخص از ۴۰ بیشتر باشد به معنای آن است که پروتئین ناپایدار می‌باشد. با تغییر دی‌پپتید مستقر در جایگاه i شاخص ناپایداری پروتئین نو ترکیب به کمتر از ۴۰ انتقال داده شد.

در ادامه سایت Protparam شاخص آلیفاتیکی پروتئین را ۸۵/۵۰ پیش‌بینی کرد. شاخص آلیفاتیکی (Aliphatic index) شاخص‌های آلیفاتیک یک پروتئین است که به عنوان حجم

در ادامه سایت Protparam شاخص ناپایداری پروتئین را ۵۷/۴۷ تخمین زد. شاخص ناپایداری (Instability index) عبارتست از میزان پایداری پروتئین در داخل لوله آزمایش (۱۳) که طبق رابطه زیر محاسبه می‌گردد:

$$i = L - 1$$

$$II = (10/L) * \sum_{i=1}^{DIWV(x[i] \times x[i+1])}$$

در رابطه فوق L نشان دهنده طول پروتئین و عبارت $DIWV(x[i] \times x[i+1])$ بیان کننده ارزش وزن ناپایداری برای دی‌پپتید مستقر در موقعیت

نسبی اشغال شده توسط زنجیره های جانبی آلفاتیک تعریف می شود. بیان کننده میزان پایداری پروتئین از دنا توره شدن در برابر حرارت است (۱۴) که طبق رابطه زیر محاسبه می گردد:

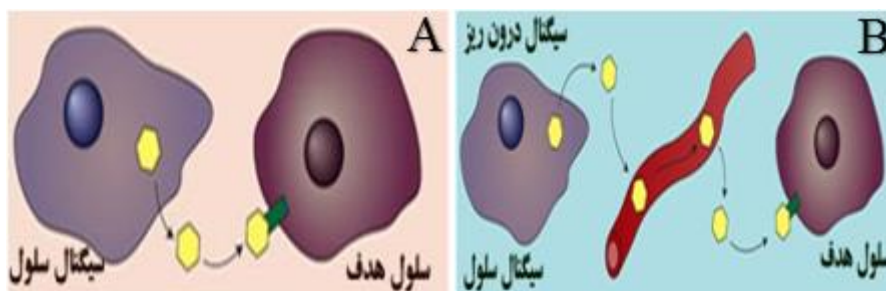
$$\text{Aliphatic index} = X(\text{Ala}) + a * X(\text{Val}) + b * (X(\text{Ile}) + X(\text{Leu}))$$

در رابطه بالا x بیان کننده درصد مولی هر یک از آمینواسیدها، a بیان کننده حجم نسبی والین زنجیره جانبی که برابر ۲/۹ است و b بیان کننده حجم نسبی نسبت لوسین به ایزولوسین زنجیره جانبی است که برابر ۳/۹ می باشد. در میزان شاخص آلفاتیکی یک پروتئین چهار آمینواسید آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین بیشترین نقش را دارند. بر این اساس برای افزایش شاخص آلفاتیکی پروتئین نو ترکیب طراحی شده در تعدادی از موقعیت ها چهار آمینواسید ذکر شده در بالا جایگزین آمینواسیدهای دیگر شدند و شاخص آلفاتیکی پروتئین به ۸۷/۶۶ ارتقا یافت. برهم کنش های هیدروفوبیک نیز شامل ارتباط بخش های غیر قطبی دو مولکول است که اسید آمینه های هیستیدین، فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین در آن شرکت می کنند (۱۵). سایت GPMaw شاخص هیدروفوبیسیته پروتئین IFN α/β را ۰/۲۷۶- پیش بینی کرد. شاخص هیدروفوبیسیته برابر میزان انرژی لازم

برای انتقال یک مول از پروتئین از محیط آبدوست به محیط آبگریز می باشد. برای افزایش شاخص هیدروفوبیسیته در تعدادی از موقعیت ها چهار آمینواسید هیستیدین، فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین جانشین آمینواسیدهای دیگر شدند.

سایت PepDraw بار خالص پروتئین گیرنده IFN α/β را ۴۷- و بار خالص پروتئین VP35 را ۲- پیش بینی کرد. بار خالص پروتئین از تفاضل مجموع آمینواسیدهای اسیدی با بار منفی (آسپارژین و گوانین) از آمینواسیدهای بازی با بار مثبت (آرژنین و لیزین) بدست می آید. برای مثبت تر کردن بار خالص پروتئین IFN α/β طراحی شده و افزایش تمایل پروتئین VP35 به آن تعدادی از آمینواسیدهای آرژنین و لیزین جایگزین آمینواسیدهای اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک شدند و بار خالص پروتئین نو ترکیب به ۳۷- رسید.

برای جلوگیری از احتمال برهم کنش پروتئین طراحی شده با ایتترفرون مسیر متفاوتی برای پروتئین نو ترکیب اعمال شده است. ایتترفرون مسیر پاراکرین را طی می کند در حالی که مسیر پیشنهادی برای پروتئین طراحی شده مسیر آندوکرین می باشد (شکل ۷).



شکل ۷- شماتیک از مسیر ترشحی پاراکرین (A) و آندوکرین (B)

پیتیدی برای ترشح پروتئین نو ترکیب به خارج از سلول طراحی شد (شکل) تا سلول پروتئین نو ترکیب را به خارج از سلول ترشح کند و پروتئین VP35 قبل از رسیدن به غشای سلول و برهمکنش با پروتئین $IFN\alpha/\beta$ با پروتئین $IFN\alpha/\beta$ نو ترکیب مواجه گردد (شکل ۸).

برای این منظور توالی سیگنال پتید پروتئین $IFN\alpha/\beta$ باعث هدایت پروتئین به غشای پلاسمایی سلول می گردد. با کمک سایت SignalP توالی سیگنال پتید تعدادی از پروتئین های ترشحی در انسان شناسایی شدند و از نواحی حفاظت شده آنها که توسط سایت ClustalO شناسایی شدند توالی سیگنال

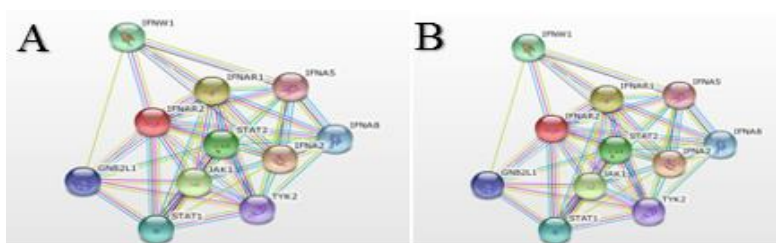
>gi|183364|gb|AAA52578.1| GM-CSF [*Homo sapiens*]
MWLQSLLLGTVACSIS
>gi|306806|gb|AAA35933.1| gro protein [*Homo sapiens*]
MARAAALSAAPSNPRLRLVALLLLVAAGRRRAAG
>gi|10834984|ref|NP_000591.1| interleukin-6 precursor [*Homo sapiens*]
MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFP
>gi|386828|gb|AAA59172.1| insulin [*Homo sapiens*]
MALWMRLPLLLALLALWGPDAAA
>gi|15021381|gb|AAK77664.1| transferrin [*Homo sapiens*]
MRLAVGALLVCAVLGLCLA
>gi|386783|gb|AAA88080.1| haptoglobin [*Homo sapiens*]
MSALGAVIALLLWGQLFA
>gi|185362|gb|AAA02914.1| IgG [*Homo sapiens*]
MDWTWRFLFVVAATGVQS
>gi|225768|prf|1313184B alpha1 antitrypsin
LLLAGLCCLLPGRLA
>gi|13528972|gb|AAH05278.1| Glucagon [*Homo sapiens*]
MKSIYFVAGLFVMLVQGSWQ
>gi|4557485|ref|NP_000087.1| ceruloplasmin precursor [*Homo sapiens*]
MKILILGIFLFLCSTPAWA

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFP

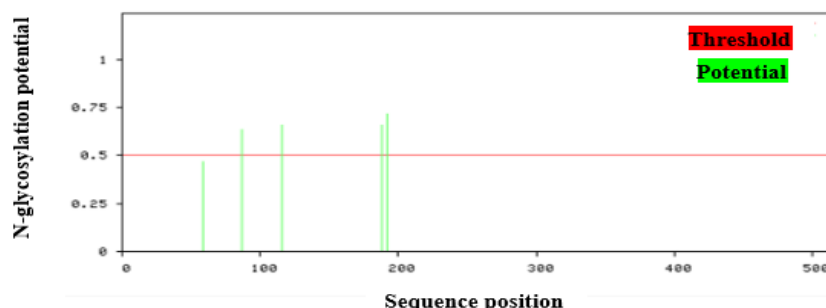
شکل ۸- توالی سیگنال پتید طراحی شده جهت هدایت پروتئین نو ترکیب به مسیر آندوکرین

از آنجا که پروتئین طراحی شده یک پروتئین نوترکیب است پس توالی آمینواسیدی آن قبلاً در جایی ثبت نگردیده است. مقایسه ژن‌های دخیل در مسیر فعالیت دو پروتئین طبیعی و نوترکیب نشان داد که دو پروتئین مسیر فعالیت مشترکی دارند. اگر توالی پروتئین قبلاً در سایت STRING ذخیره نشده باشد نرم‌افزار شبیه‌ترین توالی آمینواسیدی را شناسایی می‌کند این موضوع تا حدودی نشان می‌دهد که پروتئین طراحی شده هنوز به اندازه‌ی کافی به پروتئین اصلی شباهت دارد و عملکرد طبیعی خود را حفظ کرده است. (شکل ۹).

برای جلوگیری از وقوع واکنش‌های خود ایمنی نواحی قابل گلیکوزیلاسیون در پروتئین طبیعی شناسایی و بدون ایجاد تغییر در موقعیت فضایی خود قرار گرفتند (شکل ۱۰). علاوه بر این پروتئین طراحی شده توسط سایت Allerdicator از لحاظ آلرژی‌زایی مورد آنالیز قرار گرفت و مشخص گردید که پروتئین طراحی شده آلرژی‌زا نمی‌باشد (شکل ۱۱). با استفاده از سایت Phyre2 ساختار فضایی پروتئین نوترکیب پیش‌بینی شد و ساختار پیش‌بینی شده به کمک نرم‌افزار Molegro Molecular Viewer مورد آنالیز قرار گرفت (شکل ۱۲).



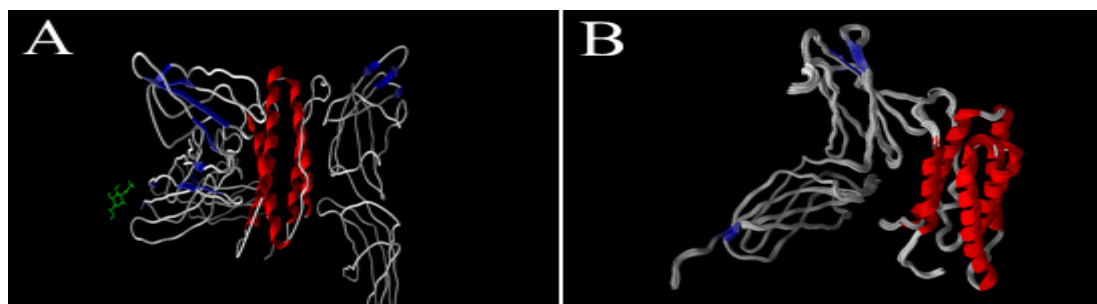
شکل ۹- مقایسه شبکه ژنی دو پروتئین طبیعی (سمت راست) و نوترکیب (سمت چپ) توسط سایت STRING.



شکل ۱۰- نواحی قابل گلیکوزیلاسیون در پروتئین

non-allergen	MALVLHTYKGNKSAEKALIAAEYVGQIDVFSDFQMGVTNKTPAFLKQNFIGKVFVLET
	EGSVFESNAIARYVSRNLNGDNSLNGSSLIEYAQIEQWIDFSSLEIYASILRWFGPRMGFM
	PYSAPAEEGAISTLKRALDALNTHLTSNTYLVGHSITLADIITVCNINLGFATVMTKKFT
	SEFFHVERYFWTVVNQPNFTKVLGDVKQTEAVPPIASKKAAQPAKPKKEEPKKKEAFVAEA
	PKLAEEEEAPKPKAKNPLDLLPSPFVLDDWKRLYSNTKSNFREVAIKGFWDMDYDEGYS
	LWFCDYKYNDENMVSFVTLNKVGGLQRMDLARKYSFGKMLICGSEGFVKGLWLFRRGP
	EIPKFMDEVYDMELYEWTKVDISDEAQKERVQMIEDAEPFEGEALLDAKCFK

شکل ۱۱ - اثبات غیر آلرژی‌زا بودن پروتئین طراحی شده



شکل ۱۲ - مقایسه ساختار فضایی پروتئین IFN α/β طبیعی (A) و نو ترکیب (B)

در انتها به کمک سایت Reverse translate توالی نوکلئوتیدی پروتئین طراحی شده بدست آمد (شکل ۱۳).

atgaacagcttttagcaccagcgctttggcccggtggcgcttttagcctgggcctgctgctg
gtgctgccggcgcgctttccggtgtatgattgcccgattataccgatgaaagctgcacc
tttaaaattagcctgcgcaactttcgagcattctgagctgggaactgaaaaaccatagc
attgtgccgaccattataccctgctgtataccattatgagcaaaccggaagatctgaaa
gtggtgaaaaactgcgcgaacaccacccgcagcttttgcgatctgaccgatgaatggcgc
agcaccatgaagcgtatgtgaccgtgctggaaggcttagcggcaacaccaccctgtt
agctgcagccataactttggctggcgattgatatgagctttgaaccgccggaatttgaa
attgtgggctttaccaacatattaacgtgatggtgtgctttccgagcattgtggaagaa
gaactgcagtttgatctgagcctggtgattgaagaacagagcgaaggcattgtgaaaaaa
cataaaccggaataaaggcaacatgagcggcaactttacatatattattgataaactg
attccgaacaccaactattgctgagcgtgtatctggaacatagcgatgaacaggcggtg
attaaaagcccgctgaaatgcaccctgctgccggccggccaggaaagcgaagcgcgga
agcgcgaaaattggcggcattattaccgtgtttctgattgcgctggtgctgaccagcacc

```
attgtgtgcctgaaatggattggccatattgcctgcgcaacagcctgccgaaagtgtg
aactttcataactttctggcggtggccgtttccggcgctgccgccgctggaagcgatggat
atgggtggaagtgatttatattaaccgcaaagtgaaagtgtgggattataactatgatttt
gaaagcgatagcaaaaccgaagcggcgccgcgcacctggggcgggcggtataccatgcat
ggcctgaccgtgcgcccgctgggcccagggcagcgcgaccagcacctggagccagctgatt
gatccgcgcagcgaaaaagaaccggatctgccgattgtggatgtggaactgaccaccatg
ccgaaacgcagcccgcagctgctggaactgctgagccgcccgtgcgaacgccgcaaaagc
ccgctgcaggatccgtttccggaagaagatgtgagcagcaccgaaggcagcggcgggccgc
attacctttaactggatctgaacagcgtgtttctgcgcgtgctggatgatgaagatagc
gatgatctggaagcggcgctgatgctgagcagccatctggaagaaatggtggatccggaa
gatccggataacgtgcagagcctgcatctgctggcgagcggcggaaggcaccagccgacc
tttccgagcccgcagcgaaggcctgtggagcgaagatgcgccgagcgatcagagcgat
accagctttagcgatgtggatctgggcatgggtatattgtgcgc
```

شکل ۱۳- توالی نوکلئوتیدی پروتئین IFN α/β نوترکیب که توسط سایت Reverse translate پیش‌بینی شده است.

بهره جستن از فناوری‌های نوین با این مسائل روبه‌رو شد. اما در کنار این قابلیت‌ها و توانمندی‌ها سایه ابهام ناشی از اثرات کمتر پیش‌بینی شده این دانش باعث شده است تا آینده‌ای توأم با چالش به تصویر کشیده شود چالش‌هایی که بیشتر جنبه‌های اجتماعی دارند و شاید بیش از همه دامن‌گیر و متوجه ژنومیک هستند.

عملکرد پروتئین‌ها وابسته به ساختار فضایی پروتئین یا همان ساختار سوم آن است، بطوری که بسیاری از نارسایی‌ها و اختلالات عملکردی پروتئین‌ها به دلیل تغییراتی است که در ساختار فضایی یک پروتئین ایجاد می‌شود. (۱۶ و ۱۷). حجم وسیعی از داده‌های مربوط به توالی پروتئین‌ها از روش‌های تحقیقاتی مدرن زیست‌شناسی مولکولی بدست آمده

محصولات نوترکیب که با دستکاری‌های ژنتیکی و تغییرات DNA در موجودات مختلف همراه است موجب تحول عظیمی در نوع و تنوع فرآورده‌های دارویی مورد مصرف شده است به طوریکه امروزه شاهد مصرف فرآورده‌های نوترکیب دارویی با وزن مولکولی بالا به جای مولکول‌های شیمیایی کوچک دیروز هستیم. داروهای پروتئینی دارای عملکرد بسیار اختصاصی هستند. لذا بر روی سایر فرآیندهای بیولوژیک غیر مرتبط اثر سوئی نخواهند گذاشت و از این نظر کمتر دارای عوارض جانبی هستند. رشد سریع مقدار داده‌های زیستی مشکلاتی برای دانشمندان علوم زیستی و بیوتکنولوژی جهت جمع‌آوری، ذخیره‌سازی و نگه‌داری اطلاعات ایجاد کرده بگونه‌ای که شاید دیگر نتوان بدون

است. رشد سریع اطلاعات آزمایشگاهی در باره‌ی توالی پروتئین‌ها و دسترسی دشوار به ساختار پروتئین‌ها سبب شده است که امروزه اهمیت پیش‌گویی ساختار بیش از هر زمان دیگر احساس شود (۱۷). با وجود تحقیقات گسترده‌ای که در زمینه ساختار سوم پروتئین‌ها انجام گرفته است اساس فیزیکی پایداری ساختار پروتئین‌ها بطور کامل شناخته نشده است (۱۸). از سوی دیگر وابستگی شدید عملکرد پروتئین به ساختار آن چشم‌اندازهای جدیدی در درمان بیماری‌ها گشوده است. به طوری که امروزه استفاده از اطلاعات مربوط به ساختار سوم پروتئین‌ها از روش‌های اساسی در طراحی منطقی داروها بشمار می‌رود (۱۹).

References

منابع مورد استفاده

1. Johnson K.M., Lange J.V., Webb P.A. and Murphy F.A. (1977). Isolation and partial characterization of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet*. 12: 569-571.
2. Khan A.S., Tshikoo F.K., Heymann D.L., Le Guenno B., Nabeth P., Kerstiens B., Fleerackers Y., Kilmarx P.H., Rodier G.R., Nkuku O., Rollin P.E., Sanchez A., Zaki S.R., Swanepoel R., Tomori O., Nichol S. T., Peters C.J., Muyembe-Tamfum J.J. and Ksiazek T.G. (1999). The reemergence of Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo. *J. Infect. Dis.* 179: 76-86.
3. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P. and Auperin D.D. (1993). Sequence analysis of the Ebola virus genome: Organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res.* 29: 215-240.
4. Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V. and Klenk H.D. (1995). GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 vaccinia virus polymerases. *Virology*. 214: 421-430.
5. Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W., Peters C.J. and Nichol S.T. (1996). The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 3602±3607.
6. Basler C.F., Wang X., Mùhlberger E., Volchkov V., Paragas J., Klenk H.D., GarcõÂa-Sastre A. and Palese P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 12289-12294.
7. Elliott L.H., Kiley M.P. and McCormick J.B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*. 147: 169-176.
8. Sen G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:255.
9. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H. and Schreiber R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-264.
10. Basler C.F., Mikulasov, A., Martinez-Sobrido L., Paragas J., Muhlberger E., Bray M., Klenk H.D., Palese P., Garcia-Sastre A. (2003). The ebolavirus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 77: 7945-79. 11. Grandvaux N., Tenoever B.R., Servant M.J., Hiscott J. (2002). The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15: 259- 267.

12. Ciechanover A. and Schwartz A.L. (1989). How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system? Trends Biochem. Sci. 14: 483-488.
13. Guruprasad K., Reddy B.V.B. and Pandit M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Eng. 4:155-161.
14. Ikai A.J. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. J. Biochem. 88: 1895-1898.
15. Kamram H.M. (2010). computational Analysis Of Protein Ligand Interaction, university of York.
16. Lehrman S.R. (1990). Protein structure. Bioprocess Technol. 7: 9-38.
17. Alberts B. (2002). Molecular Biology of the Cell, Garland Science.
18. Blundell T.L., Sibanda B.L., Montalvo R.W., Brewerton S., Chelliah V., Worth C.L., Harmer N.J., Davies O., Burke D. (2006). Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1467: 413-23.
19. Edwards Y.J., Cottage A. (2001). Prediction of protein structure and function by using bioinformatics. Methods Mol Biol. 175: 341-75.

In silico design of recombinant IFN α / β receptor protein to combat antagonistic effects of Ebola VP35 protein

Yaser Ghazi^{*1}, Fatemeh Haddadi²

1- MSc. Faculty of Sciences, Zabol of University, Iran

2- Assistant Professor Faculty of Sciences, Zabol of University, Iran

ghaziyas69@gmail.com

Abstract

The VP35 protein in Ebola virus is one of the main pathogenic components interacting to host cells and interferes with natural cellular immune responses. This is done by antagonistic potential of the viral VP35 protein which inhibits interferon regulatory factor 3 (IRF-3) protein in the infected cells and then induction of antiviral genes expression are disrupted. In the present in silico study, we have designed a novel recombinant IFN α / β receptor protein which can be secreted out by host cells and circulate in blood stream. When the body encounters the virus, the recombinant protein can binds to VP35 and inhibit its antagonistic effect on IRF-3 proteins. Evaluations made by bioinformatics softwares revealed that the novel recombinant protein show promise for ameliorating the virulence of Ebola. But the obtained results should be investigated in vitro and in vivo for further evaluation and possible approval as a therapeutic strategy.

Keywords: antagonistic, bioinformatics, Ebola virus, IFN α / β receptor, VP35 protein